

5

Immunmarker zur Diagnostik und Therapie im Zusammenhang mit Transplantat-Reaktionen

10

Beschreibung

15

Die Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle als Immunmarker zur Detektion von Transplantat-Reaktionen, ein Verfahren zur Detektion von Transplantat-Reaktionen sowie die Verwendung von Immunmarkern zur medizinischen Prophylaxe, klinischen Verlaufskontrolle, Transplantatnachbehandlung, 20 der klinischen Diagnostik und/oder der Therapie im Zusammenhang mit Zell-, Gewebe- bzw. Organtransplantationen, wobei Transplantat-Reaktionen eine Toleranz, eine Rejektionskrise oder eine Abstoßung sein können.

25

Für eine erfolgreiche Organtransplantation ist es notwendig, dass das Spenderorgan histologisch möglichst weitgehend mit dem Empfängerorgewebe übereinstimmt. Diese Übereinstimmung wird unter anderem durch das HLA-System (Abk. für (engl.) human leucocyte antigen) bestimmt. Dabei 30 handelt es sich um ein komplexes System von Gewebeatigenen, die auf fast allen Zellen vorkommen. Dieses System spielt eine wichtige physiologische Rolle bei immunologischen Abwehrreaktionen (Erkennung von „Selbst“ und „Nichtselbst“). Vor jeder Transplantation wird deshalb 35 eine so genannte Gewebetypisierung bei Organspender und -

5 empfänger vorgenommen, um eine möglichst weitgehende HLA-Kompatibilität zu gewähren.

Aufgrund des extremen genetischen Polymorphismus existiert eine außerordentlich große Anzahl verschiedener HLA-Moleküle. Eine vollständige Übereinstimmung wird ausschließlich
10 bei eineiigen Zwillingen beobachtet, ansonsten sind HLA-Moleküle für jeden Menschen einzigartig.

Problematisch ist jedoch, dass trotz einer weitgehenden HLA-Übereinstimmung zwischen Empfänger und Spender eine Abstoßungsreaktion gegen das transplantierte Organ nicht
15 ausgeschlossen werden kann. Trotz dieser Schwierigkeiten stellt die Transplantation die Therapie der Wahl bei irreversiblen Organversagen dar.

Der ansteigende Bedarf an Organtransplantationen zusammen mit dem verminderten Angebot an Organen sowie die oben
20 beschriebenen Probleme erfordern eine Optimierung der bekannten Therapien. Durch die Einführung neuer verbesserter Immunsuppressiva konnte die 1-Jahrüberlebensrate auf 90% erhöht werden. Allerdings konnten die Langzeittransplantatüberlebensraten bisher nicht
25 zufriedenstellend verbessert werden. Trotz moderner Immunsuppressiva kommt es immer noch bei der Mehrzahl der Patienten zur Entwicklung chronischer Transplantatdysfunktionen. Klinische und subklinische akute Reaktionen, auch wenn sie zunächst erfolgreich mit einer
30 Rejektionstherapie behandelt werden, stellen dabei den größten unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung dieser späten Transplantatverluste dar. Eine effiziente Diagnostik und/oder Therapie derartiger - vor allem

5 subklinisch verlaufender - Prozesse ist daher von großer Wichtigkeit.

Eine Induktion einer Langzeit- und vornehmlich medikamentenfreien Transplantatakzeptanz ohne Beeinträchtigung der Organ-, Gewebe- oder Zellfunktionen und der
10 Immunkapazität des Transplantatempfängers ist daher von großer Bedeutung. Klinisch wird die Toleranz als permanentes Transplantatüberleben mit normaler Organfunktion bei Abwesenheit akuter und chronischer Abstoßungsreaktionen und dem Erhalt der antimikrobiellen
15 Immunreaktivität definiert.

Neue Strategien zur Induktion einer Transplantattoleranz bestehen in der Applikation immunregulatorischer Proteine oder in einer Induktion eines Chimerismus. Bei den immunregulatorischen Proteinen kann es sich entweder um
20 Antikörper handeln, die eine Depletion der donor-reaktiven T-Zellen bewirken, z.B. anti-CD3-Immunotoxin, oder um Antikörper und Proteine, die die Aktivierung der donor-reaktiven T-Zellen beeinflussen, z.B. anti-CD4-Antikörper, anti-CD40L-Antikörper oder CTLA4-Ig. Chimerismus bedeutet
25 das parallele Vorhandensein von Blutleukozyten des Spenders und des Empfängers mit Hilfe nicht-myeloablativer Verfahren zur Transplantation von Stammzellen des Spenders.

Bisher erfolgte nach der Transplantation eine dauerhafte Kontrolle des Zustandes des Transplantates dadurch, dass
30 die Funktion des Transplantates als Maß herangezogen wird; z.B. durch die Bestimmung des Serumkreatininspiegels im Falle eines Nierentransplantates. Außerdem werden Biopate entnommen und nach dem „Banff Score“ histologisch

5 beurteilt. Damit kann beurteilt werden, ob Veränderungen
assoziiert mit einer akuten Abstoßung - Infiltration
mononukleärer Zellen - oder chronische Abstoßungen
(Vaskulopathie) nachweisbar sind.

10 Klinisch manifeste Rejektionen werden durch Funktions-
verschlechterung der Organe definiert, wie beispielsweise
Herzfunktion, dem Serumkreatinin in dem der Lungenfunktion
oder anderen. Leider stehen diese Funktions-
verschlechterungen am Ende einer Effektorkette. Eine
frühzeitige Diagnostik bereits subklinisch ablaufender
15 Prozesse wäre sehr hilfreich. Auch ist eine
Funktionsverschlechterung nicht immer durch eine Rejektion
bedingt; es gibt auch andere Ursachen wie Toxizität und
Infektionen, die differentialdiagnostisch abgegrenzt werden
müssen, was gegenwärtig viel Zeit beansprucht und oft sehr
20 schwierig ist. Subklinisch verlaufende Reaktionen können
bisher nur durch Protokollbiopsien und konventionelle
Histologie, zumindest innerhalb gewisser Grenzen,
verlässlich beurteilt werden. Jedoch werden dabei auch
Infiltrate als negativ beurteilt, die möglicherweise eine
25 protektive Wirkung auf das Transplantat haben, wie in
Tierexperimenten gezeigt werden konnte. Für Nieren-
transplantate wurde nachgewiesen, dass molekularbiologische
Untersuchungen im Urin eine klinisch manifeste Rejektion
reflektieren können, aber es fehlen Untersuchungen zum
30 subklinischen Bereich der Rejektionen. Es besteht also ein
großer Bedarf an Markern für das Monitoring von
Transplantaten (Bioptate, Urin, Lavage, Blut etc), um
unerwünschte Immunreaktionen gegen das Transplantat

5 rechtzeitig - d.h. möglichst vor der Organschädigung, - und
differentialdiagnostisch sicher - als Abgrenzung gegen
andere Prozesse, die die Organfunktion beeinträchtigen - zu
erfassen.

Aufgrund der Nebenwirkungen der chronischen Applikation der
10 derzeit üblichen Mehrfachimmunsuppressivaschemata wird
immer wieder versucht, bei gut gehender Funktion einzelne
oder mehrere der immunsuppressiven Komponenten abzusetzen -
nachteilhafterweise ist dieser Ansatz immer durch das
Auftreten von akzelerierten Abstoßungsprozessen, manchmal
15 erst Jahre nach Absetzen, gefährdet. Es fehlt völlig an
Parametern, die ein derartiges Vorgehen verlässlich
individuell optimieren könnten. Eine Verbesserung der
bisherigen Strategien durch Einführung toleranzinduzierter
Protokolle würde die Therapie durch weniger Nebenwirkungen
20 und weniger Kosten revolutionieren. Die Übertragung der
oben erwähnten toleranzinduzierenden Therapien auf den
Menschen birgt jedoch etliche Gefahren, da nach Absetzen
der Toleranzinduktionstherapie rechtzeitig Therapieversager
identifiziert werden müssen, um eine irreversible
25 Schädigung des Transplantates durch Rejektion zu
verhindern. Selbst in Tiermodellen werden niemals 100% der
Empfänger tolerant.

Nachteilhaft bei den bisherigen Methoden ist es, dass keine
Entscheidungen über das sichere Absetzen einer
30 immunsuppressiven Therapie getroffen werden können, ohne
dabei das Auftreten von Rejektionskrisen zu riskieren.

Ein weiterer Nachteil ist, dass die bekannten Methoden es
nicht ermöglichen, während oder nach der Behandlung, auch

5 nach konventionellen Therapien, bevor eine Transplantats-
funktionsverschlechterung auftritt, eine Vorhersage von
Rejektionskrisen zu ermöglichen. Die bisher zur Verfügung
stehenden diagnostischen Mittel und Methoden sind nur
begrenzt zur Beurteilung einer toleranzinduzierenden
10 Therapie einsetzbar. Die Beurteilung der Therapie
hinsichtlich der Funktion des Transplantates - z.B. des
Serumkreatinins - kommt zu spät, da es bei einem
nachweisbaren Anstieg des Serumkreatinins schon zu einer
Schädigung des transplantierten Organs, beispielsweise der
15 Niere, gekommen ist. Hinsichtlich der toleranzinduzierenden
Therapien bedeutet ein signifikanter Anstieg des
Serumkreatinins ein Fehlschlagen der Therapie und für den
Patienten wahrscheinlich das Umsteigen auf konventionelle
Immunsuppressiva mit den bekannten Nebenwirkungen. Auch die
20 bekannte Analyse einer Biopsie ist in diesem Fall nur
bedingt hilfreich, da viele toleranzinduzierenden
Therapien, wie z.B. mit anti-CD4-Antikörpern nur bedingt
die Infiltration mononukleärer Zellen in das Transplantat
verhindern. Innerhalb der bisherigen Methoden und Verfahren
würde dies als akute Abstoßungs- bzw. Rejektionskrise
25 betrachtet werden, und der Patient würde mit hochdosierten
konventionellen Immunsuppressiva behandelt werden. Eine
hochdosierte Gabe konventioneller Immunsuppressiva kann
sich jedoch zusätzlich negativ auf den Erfolg der toleranz-
induzierten Therapie auswirken, was ebenfalls ein
30 Fehlschlagen der Therapie bedeuten würde. Aber auch für die
konventionellen Immunsuppressionen wären verbesserte
diagnostische Mittel und Methoden hinsichtlich der
Früherkennung klinischer und subklinischer akuter

5 Abstoßungskrisen und beginnender chronischer Rejektions-
prozesse hilfreich. Dies würde es unter anderem
ermöglichen, die Therapie zu variieren bevor eine
nachweisbare Schädigung des Transplantates - z.B. Anstieg
des Serumkreatinins - vorliegt. Außerdem kann eine
10 Verschlechterung der Organfunktion auch durch Nebenwirkung
einer hochdosierten immunsuppressiven Therapie oder durch
Infektionen im Transplantat hervorgerufen werden, was durch
bekannte Methoden ebenfalls nicht detektiert werden kann.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, effiziente und zu-
15 verlässige Immunmarker bereitzustellen, welche eine sichere
und schnelle Vorhersagbarkeit des Risikos einer
Transplantatabstoßung bzw. des Fehlen selbiger - als Form
einer Toleranz - in medizinischer Prophylaxe, klinischer
Verlaufskontrolle oder der Transplantatnachbehandlung
20 ermöglichen.

Die vorliegende Erfindung löst dieses technische Problem
durch die Bereitstellung eines isolierten Nucleinsäure-
moleküls ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

- 25 a) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz
ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1 -
8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen,
- b) ein Nucleinsäuremolekül, welches mit einer
Nucleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen
hybridisiert,
- 30 c) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine
Nucleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie

5 aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) oder b) funktionsanalog zu sein,

d) ein Nucleinsäuremolekül, das in Folge des genetischen Codes zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) - c) degeneriert ist und

10 e) ein Nucleinsäuremolekül gemäß einer Nucleotidsequenz nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) bis d) ist.

15 Es war überraschend, dass die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle mit Entzündungen, insbesondere chronischen Entzündungen, Autoimmunerkrankungen, Läsionen, allgemeinen Wunden und Transplantat-Reaktionen, insbesondere mit Transplantatrejektionen oder anderen
20 Transplantatdysfunktionen sowie dem Ausbleiben dieser - als Form der Transplantattoleranz - assoziiert sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Nucleinsäuremolekül, das eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz ausgewählt aus der
25 Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1-8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen funktionsanalog zu sein, zumindest zu 40% homolog. Im Sinne der Erfindung heißt, um zu den genannten Nucleotidsequenzen bzw. den mit diesen Nucleotidsequenzen hybridisierenden Sequenzen funktions-
30 analog zu sein, dass die Homologen bei Transplantat-Reaktionen ein Verhalten zeigen, das Rückschlüsse auf das

5 Transplantat und dessen Verhältnis zum Empfängerorganismus zulässt.

Funktionsanaloge Sequenzen sind im Sinne der Erfindung all jene Sequenzen, die der Fachmann als gleichwirkend identifizieren kann. Beispielsweise ist es möglich, dass
10 der Fachmann in verschiedenen Versuchstieren, wie z.B. der Ratte oder dem Kaninchen, erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle identifiziert und so aufgrund von Homologie-Untersuchungen in der Lage ist, funktionsanaloge Strukturen in anderen Organismen, wie beispielsweise Schimpansen oder
15 Hunden, zu identifizieren. Selbstverständlich ist es auch möglich, dass der Fachmann aufgrund seiner Kenntnis der in der Maus oder Ratte gefundenen Nucleinsäuremoleküle auch in humanen Patienten Analoge und Homologe aufgrund von Homologie- oder Analogie-Untersuchungen detektiert.
20 Weiterhin ist es möglich, dass der Fachmann im humanen Bereich isolierte erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle in spezifischen Versuchstieren detektiert, mit denen bestimmte Transplantationsreaktionen untersucht werden können, wie beispielsweise in Schweinen oder auch in wirbellosen
25 Organismen, wie z.B. Nematoden bzw. anderen Organismen, die für spezifische Fragestellungen der Transplantationsbiologie herangezogen werden können.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung weist das Nucleinsäuremolekül mindestens 60%,
30 vorzugsweise 70%, bevorzugt 80%, ganz besonders bevorzugt 90% Homologie zu einem Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1-8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen

5 auf, wobei dieses Nucleinsäuremolekül eine biologische Aktivität wie die unter SEQ ID Nr. 1-8 aufgezeigten Sequenzen oder deren komplementären Sequenzen aufweist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Nucleinsäuremolekül eine genomische DNA, eine cDNA
10 und/oder eine RNA. Besonders bevorzugt ist das Nucleinsäuremolekül eine mRNA.

Die Erfindung betrifft auch einen Vektor, der ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül umfasst. Weiterhin betrifft die Erfindung auch eine Wirtszelle, die den Vektor
15 im erfindungsgemäßen Vektor umfasst. Die Erfindung betrifft auch ein Polypeptid, was durch ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül kodiert wird.

Die Erfindung betrifft auch ein Erkennungsmolekül, das gegen das Nucleinsäuremolekül, den Vektor, die Wirtszelle
20 und/oder das Polypeptid gerichtet ist. Erkennungssubstanzen im Sinne der Erfindung sind Moleküle, die mit den genannten Strukturen wie Nucleinsäuremolekülen oder -sequenzen, Vektoren, Wirtszellen und/oder Polypeptiden bzw. deren Fragmenten wechselwirken können; insbesondere so
25 wechselwirken, dass eine Detektion dieser Strukturen möglich ist. Die Erkennungssubstanzen können insbesondere spezifische Nucleinsäuren sein, die mit den genannten Nucleinsäuremolekülen binden, aber auch Antikörper, Fluoreszenzmarker, markierte Kohlenhydrate oder Lipide,
30 Antisense-Konstrukte, cDNA oder mRNA-Moleküle bzw. deren Fragmente. Es ist selbstverständlich auch möglich, dass die Erkennungssubstanzen nicht Proteine oder Nucleinsäuren bzw. Antikörper sind, sondern gegen diese gerichtete Antikörper.

5 Die Erkennungssubstanzen können in solch einem Fall insbesondere sekundäre Antikörper sein.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung sind die Erkennungsmoleküle ein Antikörper, ein Antikörperfragment und/oder ein Antisensekonstrukt, insbesondere ein RNA-
10 Interferenzmolekül.

Die Autoantikörper im Sinne der Erfindung binden die erfindungsgemäßen Polypeptide spezifisch. Die Antikörper können auch modifizierte Antikörper sein (z.B. oligomere, reduzierte, oxidierte und markierte Antikörper). Der in der
15 vorliegenden Beschreibung verwendete Begriff Antikörper umfasst sowohl intakte Moleküle als auch Autoantikörper-Fragmente, wie Fab, F(ab')₂ und Fv, die bestimmte Epitop-Determinanten der Polypeptide binden können. Bei diesen Fragmenten ist die Fähigkeit des Antikörpers zur selektiven
20 Bindung seines Antigens oder Rezeptors teilweise erhalten geblieben, wobei die Fragmente wie folgt definiert sind:

(1) Fab, das Fragment, das ein monovalentes Antigenbindungsfragment eines Antikörper-Moleküls enthält, lässt sich mittels Spaltung eines ganzen Antikörpers mit dem
25 Enzym Papain erzeugen, wobei eine intakte leichte Kette und ein Teil einer schweren Kette erhalten werden;

(2) das Fab'-Fragment eines Antikörper-Moleküls lässt sich mittels Behandlung eines ganzen Antikörpers mit Pepsin und anschließender Reduktion gewinnen, wobei eine
30 intakte leichte Kette und ein Teil der schweren Kette

5 erhalten werden; pro Antikörper-Molekül werden zwei Fab'-Fragmente erhalten;

(3) $F(ab')_2$, das Fragment des Antikörpers, das sich mittels Behandlung eines ganzen Antikörpers mit dem Enzym Pepsin ohne anschließende Reduktion erhalten lässt; $F(ab')_2$ ist eine Dimer von zwei Fab'-Fragmenten, die durch zwei Disulfid-Bindungen zusammengehalten werden;

10

(4) F_v , definiert als gentechnisch verändertes Fragment, das den variablen Bereich der leichten Kette und den variablen Bereich der schweren Kette enthält und in Form von zwei Ketten exprimiert wird; und

15

(5) Einzelketten-Antikörper („SCA“), definiert als gentechnisch verändertes Molekül, das den variablen Bereich der leichten Kette und den variablen Bereich der schweren Kette enthält, die durch einen geeigneten Polypeptid-Linker zu einem genetisch fusionierten Einzelketten-Molekül verbunden sind.

20

Der in der vorliegenden Erfindung verwendete Begriff Epitop bedeutet eine beliebige Antigen-Determinante auf dem Polypeptid. Epitop-Determinanten bestehen normalerweise aus chemisch aktiven Oberflächen-Gruppierungen von Molekülen, wie Aminosäuren oder Zucker-Seitenketten, und besitzen normalerweise sowohl spezifische Merkmale der dreidimensionalen Struktur als auch spezifische Ladungsmerkmale.

25

30

Die Erfindung betrifft auch Vakzine, die das Nucleinsäuremolekül, den Vektor, die Wirtszelle, das

5 Polypeptid und/oder das Erkennungsmolekül gegebenenfalls mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger umfassen. Bei dem pharmazeutisch akzeptablen Träger handelt es sich um an sich bekannte pharmazeutische Hilfs- und/oder Zusatzstoffe. Bei diesen, dem Fachmann an sich bekannten Zusatz- und
10 Trägerstoffen, kann es sich auch um Liposomen bzw. um in der Gentechnik bekannte Strukturen bzw. Lösungen und/oder Puffergemische oder um andere Substanzen aus dem Bereich der Galenik handeln.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Detektion von
15 Transplantat-Reaktionen in einer Probe von einem Patienten, wobei in der Probe ein Level von mindestens einem Nucleinsäuremolekül ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

- 20 a) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1 - 8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen,
- b) ein Nucleinsäuremolekül, welches mit einer Nucleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen hybridisiert,
- 25 c) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) oder b) funktionsanalbg zu sein,
- d) ein Nucleinsäuremolekül, das in Folge des genetisches Codes zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) - c) degeneriert
30 ist und

5 e) ein Nucleinsäuremolekül gemäß einer Nucleotidsequenz nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) bis d) ist

10 bestimmt und der Level mit einem Kontroll-Level einer Vergleichsprobe von einem gesunden Patienten verglichen wird, wobei durch einen modifizierten Level in der Probe im Vergleich zu dem Kontroll-Level die Transplantat-Reaktionen - was auch das Fehlen selbiger als Toleranz einschließt -
15 detektiert wird.

Als Transplantat-Reaktion im Sinne der Erfindung wird demgemäß jede physiologische und pathophysiologische Wechselwirkung des Transplantates mit dem Empfängerorganismus aber auch jede isolierte Reaktion innerhalb des
20 Transplantates verstanden. Die Transplantat-Reaktion kann daher im Sinne der Erfindung eine Toleranz sein bzw. eine Abstoßung des Transplantates. Demgemäß ist eine Transplantat-Reaktion im Sinne der Erfindung auch ein nicht pathologischer, d.h. ein normaler oder gesunder, Zustand,
25 in dem sich das Transplantat selbst und in Bezug auf den Empfängerorganismus befinden kann. Eine Probe im Sinne der Erfindung ist die Bezeichnung für ein durch Probenentnahme entnommenes biologisches Gut oder eines Teiles bzw. einer kleinen Menge eines solchen, dessen Beschaffenheit
30 chemisch, biologisch, klinisch oder ähnlich geprüft werden soll. Die Probenentnahme aus dem Patienten bzw. aus gewonnenen humoralen oder zellulären Bestandteilen des Patienten erfolgt insbesondere so, dass die entnommene

5 Teilmenge einem Durchschnitt der gesamten Menge entspricht.
Die durch Untersuchung der Probe ermittelten Merkmale
dienen der Beurteilung der durch die Probe erfassten Menge,
die Rückschlüsse auf die Gesamtmenge, z.B. ein gesamtes
10 transplantiertes Organ, wie Leber, Milz, Blut oder aber auch
von nicht transplantierten Bestandteilen, wie z.B. dem
Immunsystem, zulässt. Für die Untersuchung können die
Proben durch Mischen, Zerteilen, Zerkleinern, Zugabe von
Enzymen oder Markern bzw. anders vorbehandelt werden. Dem
15 Fachmann sind verschiedene Möglichkeiten der Vorbehandlung
der Proben bekannt. Selbstverständlich kann es auch
vorgesehen sein, dass die Probe so entnommen wird, dass sie
keinem Durchschnitt der gesamten Menge entspricht. Eine
Probe können alle biologischen und nichtbiologischen
Materialien sein, wie biologische Gewebe und Flüssigkeiten,
20 wie beispielsweise Blut, Lymphe, Urin, Gehirnflüssigkeit
und andere.

Ein Transplantat im Sinne der Erfindung ist ein transplan-
tiertes oder zu transplantierendes Organ, Gewebe oder eine
Zelle bzw. eine Zellansammlung. Im Sinne der Erfindung
25 können Transplantate jedoch auch bestimmte Implantate sein,
die aus Stoffen bzw. Teilen bestehen, die zur Erfüllung
bestimmter Ersatzfunktionen für einen begrenzten Zeitraum
oder auf Lebenszeit in einen Körper eingebracht werden. Die
Implantate können beispielsweise aus anorganischer Materie
30 bestehen, die mit organischen Substanzen, wie
beispielsweise Knorpel oder Knochenzellen, beschichtet ist.

Unter einer Transplantatabstoßung gemäß der Erfindung ist
die Induktion einer Immunreaktion des Empfängers auf das

5 Transplantat zu verstehen, wobei eine Immunreaktion des Empfängers eine spezifische Schutz- oder Abwehrreaktion des Körpers gegen die Antigene bzw. andere Strukturen des Transplantates ist.

Ein Patient im Sinne der Erfindung ist jeder Organismus,
10 der ein Transplantat umfasst, insbesondere ein humaner Organismus. Ein gesunder Patient im Sinne der Erfindung ist ein Patient, dessen Zustand es erlaubt, als Referenz für das vorliegende Verfahren verwendet zu werden. Gesund im Sinne der Erfindung muss nicht die völlige Abwesenheit von
15 Krankheiten, Transplantaten oder pathogenen Veränderungen bedeuten. Der gesunde Patient stellt entweder einen einzelnen Patienten oder eine Durchschnittsmenge von Patienten dar, die als Vergleichsgruppe dergestalt dienen können, dass eine Veränderung des Levels der genannten
20 Nucleinsäuremoleküle oder der Strukturen, für die sie kodieren bzw. den Erkennungssubstanzen bestimmt werden kann. Eine Modifikation des Levels im Vergleich zum Kontrolllevel heißt, dass die genannten Nucleinsäuremoleküle bzw. die oben genannten Immunmarker, wie
25 insbesondere die Peptide oder die Erkennungssubstanzen, in ihrer Konzentration oder Aktivität als Protein, als Nucleinsäuremolekül oder als Antikörper detektierbare Veränderungen gegenüber dem Kontroll-Level aufweisen.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung ist das
30 Transplantat ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Lunge, Milz, Herz, Leber, Pankreas und/oder von Geweben, insbesondere Inseln, Aorten, Knorpeln. Selbstverständlich ist es möglich, dass die jeweils aufgezeigten Organe bzw.

5 Gewebestrukturen allein oder in Kombination transplantiert werden können.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird der Level als eine DNA-, eine RNA-Konzentration, eine Genexpression, eine Kopienanzahl einer Nucleinsäure, eine
10 Peptidkonzentration, eine Peptidaktivität und/oder als eine Konzentration von Isoformen bestimmt. Mit Vorteil kann der Fachmann verschiedene Möglichkeiten wählen, um den Level von mindestens einem Nucleinsäuremolekül zu bestimmen. Eine Möglichkeit ist beispielsweise die Bestimmung der
15 Peptidkonzentration, die durch das Nucleinsäuremolekül kodiert werden, mit spektrografischen Methoden. Es ist jedoch auch möglich, den Level auf der RNA- bzw. DNA-, insbesondere mRNA- und/oder cDNA-Ebene zu bestimmen oder beispielsweise über die Aktivität der durch sie kodierten
20 Proteine und/oder Peptide bzw. deren Fragmente. Es ist selbstverständlich möglich, dass der Level nur in dem Transplantat oder in Teilstücken desselben innerhalb oder außerhalb des Körpers bestimmt wird bzw. dass er in dem umgebenden Gewebe bzw. Körperflüssigkeiten bzw. in
25 Biopsiematerialien oder in Flüssigkeiten, wie beispielsweise Uria, Lymphe oder Blut, detektiert wird.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird der Level als eine mRNA-Konzentration bestimmt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung
30 ist die Transplantatreaktion eine Rejektionskrise, eine Abstoßungsreaktion, ein Abstoßungsverlauf, eine Toleranzreaktion und/oder ein Toleranzverlauf, der durch das erfindungsgemäße Verfahren detektiert wird. Der

5 Abstoßungsverlauf und die Abstoßungsreaktion können
beispielsweise klinisch bzw. subklinisch verlaufen. Eine
Toleranz im Sinne der Erfindung ist beispielsweise eine
lang anhaltende normale Funktion des transplantierten
Organs ohne Serumkreatininanstieg bzw. Proteinurie über
10 mehr als 100, bevorzugt 200, ganz besonders bevorzugt 300
Tage.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung
wird durch einen verminderten Level eines
Nucleinsäuremoleküls umfassend eine Nucleotidsequenz
15 ausgewählt aus der Gruppe umfassend

- a) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz
ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 3
und SEQ ID Nr. 7 oder deren komplementären
Nucleotidsequenzen,
- 20 b) ein Nucleinsäuremolekül, welches mit einer
Nucleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen
hybridisiert,
- c) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine
Nucleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie
25 aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) oder b)
funktionsanalog zu sein,
- d) ein Nucleinsäuremolekül, das in Folge des genetisches
Codes zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) - c)
degeneriert ist und
- 30 e) ein Nucleinsäuremolekül gemäß einer Nucleotidsequenz
nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen,

5 Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder
Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer
Nucleotidsequenz gemäß a) bis d) ist

die Abstoßungsreaktion, der Abstoßungsverlauf und/oder die
Rejektionskrise detektiert. Ein Abstoßungsverlauf kann
10 beispielsweise der Verlauf einer Abstoßungsreaktion mit
bzw. ohne Medikamentengabe sein, wobei diese Medikamente
beispielsweise immunsuppressierende Substanzen sein können.
Mit Vorteil kann durch den verminderten Level der
Nucleotidsequenzen bzw. deren komplementären
15 Nucleotidsequenzen bzw. Nucleinsäuremolekülen, welche mit
diesen Nucleotidsequenzen unter stringenten Bedingungen
hybridisieren oder Nucleotidsäuremoleküle, die eine
ausreichende Homologie aufweisen, um zu den genannten
Nucleotidsequenzen funktionsanalog zu sein, bestimmt
20 werden, ob das Transplantat selbst oder in Bezug auf den
Empfängerorganismus zu unphysiologischen bzw.
pathologischen Prozessen neigt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung
wird durch einen erhöhten Level eines Nucleinsäuremoleküls
25 umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe
umfassend

a) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz
ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1
und SEQ ID Nr. 2 oder deren komplementären
30 Nucleotidsequenzen,

- 5 b) ein Nucleinsäuremolekül welches mit einer Nucleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen hybridisiert,
- c) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie
- 10 aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) oder b) funktionsanalog zu sein,
- d) ein Nucleinsäuremolekül, das in Folge des genetischen Codes zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) - c) degeneriert ist und
- 15 e) ein Nucleinsäuremolekül gemäß einer Nucleotidsequenz nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) bis d) ist
- 20 die Abstoßungsreaktion, der Abstoßungsverlauf und/oder die Rejektionskrise detektiert. Im Sinne der Erfindung gehören zu den genannten Nucleinsäuremolekülen insbesondere die Nucleinsäuremoleküle, die unter stringenten Bedingungen mit den genannten Nucleinsäuremolekülen hybridisieren als auch
- 25 solche Nucleinsäuremolekülen, die eine ausreichende Homologie aufweisen, um zu den genannten Nucleinsäuremolekülen funktionsanalog zu sein sowie solche, die infolge des genetischen Codes degeneriert sind bzw. durch Deletionen, Additionen, Substitutionen,
- 30 Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu der genannten Nucleotidsequenz der Nucleinsäuremoleküle sind.

5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird durch einen erhöhten Level eines Nucleinsäuremoleküls ausgewählt aus der Gruppe umfassend

- 10 a) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5, SEQ ID Nr. 6, SEQ ID Nr. 7 und SEQ ID Nr. 8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen,
- 15 b) ein Nucleinsäuremolekül welches mit einer Nucleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen hybridisiert,
- c) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) oder b) funktionsanalog zu sein,
- 20 d) ein Nucleinsäuremolekül, das in Folge des genetisches Codes zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) - c) degeneriert ist und
- 25 e) ein Nucleinsäuremolekül gemäß einer Nucleotidsequenz nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) bis d) ist

die Toleranzreaktion oder der Toleranzverlauf detektiert. Mit Vorteil ist es also möglich, durch die Detektion eines erhöhten Levels der genannten Nucleinsäuremoleküle zu bestimmen, ob das transplantierte Organ, das

30

5 transplantierte Gewebe bzw. die einzelne Zelle von dem Empfängerorganismus in einer Art und Weise akzeptiert wird, dass pathologische Reaktionen weitestgehend ausbleiben.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Nucleinsäuremoleküls, des Vektors, der Wirtszelle, des
10 Polypeptids, des Erkennungsmoleküls und/oder der Vakzine in der medizinischen Prophylaxe, der klinischen Verlaufskontrolle, der Transplantatnachbehandlung, der klinischen Diagnostik und/oder der Therapie. Der Fachmann kann die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle bzw.
15 Vektoren, Wirtszellen, Polypeptide, Erkennungsmoleküle und/oder Vakzine im Bereich der Prophylaxe, Verlaufskontrolle, Diagnostik oder Therapie einsetzen. Beispielsweise ist es möglich, die biologischen Strukturen, die bei einer Abstoßungsreaktion bzw. einer Reaktionskrise
20 in ihrem Level erhöht sind, in Form einer Therapie zu erniedrigen, um somit eine Toleranz bzw. Bedingungen für eine nachfolgende Toleranz des Transplantates zu ermöglichen, zu indizieren bzw. zu unterstützen. Dies kann beispielsweise durch die Gabe von Antisense-Konstrukten
25 bzw. RNA-Molekülen erfolgen, die in der Lage sind, eine RNA-Interferenz zu erzeugen. Es ist jedoch auch möglich, die durch die Nucleinsäuremoleküle kodierten Peptide bzw. Proteine, deren Level auch erhöht sein kann, durch Antikörper funktional so zu beeinträchtigen, dass ein
30 physiologischer Zustand im Transplantat bzw. zwischen Transplantat und Empfängerorganismus indiziert, erreicht oder unterstützt werden kann. Selbstverständlich ist es auch möglich, einen verminderten Level von

5 Nucleinsäuremolekülen in Form einer therapeutischen
Maßnahme zu erhöhen, wenn ein verminderter Level mit einer
Abstoßungsreaktion bzw. einer Rejektionskrise assoziiert
ist. Dem Fachmann sind verschiedene Möglichkeiten bekannt,
den Level der genannten Substanzen oder Moleküle zu
10 modifizieren, im vorliegenden Fall insbesondere zu erhöhen.
Eine Erhöhung eines Proteinlevels ist beispielsweise
dadurch möglich, dass der Nucleinsäure, die das
entsprechende Protein kodiert, die natürlich im Organismus
oder Transplantat vorliegen kann bzw. in das
15 transplantierte Organ eingebracht wird, ein zusätzlicher
Promoter vorgeschaltet bzw. der ursprüngliche Promoter in
seiner Aktivität verstärkt wird. Weiterhin ist es möglich,
die Kopienanzahl der Nucleinsäuren im entsprechenden
Zielgewebe zu erhöhen, wodurch mehr Nucleinsäuremoleküle
20 bereitgestellt werden und mehr Proteine exprimiert werden
können. Dem Fachmann ist bekannt, dass derartige Maßnahmen
nicht nur innerhalb der Therapie sondern auch in einem
Protokoll zur Prophylaxe bzw. das zur Transplantat-
nachbehandlung durchgeführt werden können. Klinische
25 Verlaufskontrollen bzw. diagnostische Maßnahmen können mit
Vorteil so erfolgen, dass im Verlauf von bestimmten, durch
den Fachmann festzulegenden Zeitabständen im Urin bzw.
Biopsiematerial eine Quantifizierung der Expression der
Nucleinsäuremoleküle bzw. der sie kodierenden Peptide oder
30 Fragmente erfolgt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung
werden die Nucleinsäuremoleküle und ihre Homologe bzw. die
modifizierten Nucleinsäuremoleküle zur Detektion von T-

5 Zell-vermittelten Immunprozessen, insbesondere von pathogenen T-Zell-vermittelten Immunprozessen verwendet. Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle und auch ihre Abkömmlinge, ihre komplementären Strukturen sowie die Peptide, die sie kodieren, können beispielsweise genutzt
10 werden, um Komplementreaktionen bzw. andere Prozesse zu detektieren, bei denen T-Zellen eine gewisse Bedeutung haben. Insbesondere können pathogene T-zell-vermittelte Immunprozesse wie z.B. Diabetes mellitus Typ I, rheumatoide Arthritis, chronische Darmentzündung, Dermatosen und/oder
15 Allergien detektiert werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden als T-Zell-vermittelte Immunprozesse Autoimmunerkrankungen oder Entzündungen detektiert, insbesondere eine antiglomeruläre Basalmembranrankheit,
20 Autoimmunkrankheiten des Nervensystems, ein systemischer Lupus erythematodes, eine Addison-Krankheit, ein Antiphospholipid-Syndrom, eine IgA-Glomerulonephritis, ein Goodpasture-Syndrom, ein Lambert-Eaton-Myasthenie-Syndrom, ein bullöses Pemphigoid, eine thrombozytopenische,
25 idiopathische Purpura, eine Autoimmun-Thyreoiditis, eine rheumatoide Arthritis, ein insulinabhängiger Diabetes mellitus, ein Pemphigus, eine autoimmunhämolytische Anämie, ein Dermatitis herpetiformis Dühring, eine membranöse Glomerulonephritis, eine Graves-Krankheit, eine
30 sympathische Ophthalmie, Autoimmun-Polyendokrinopathien, multiple Sklerose und/oder Reiter-Krankheit.

5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die T-Zell-vermittelten Immunprozesse physiologische, pathologische und/oder klinische Transplantat-Reaktionen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die Transplantat-Reaktionen eine Rejektionskrise, eine
10 Abstoßungsreaktion, ein Abstoßungsverlauf, eine Toleranzreaktion und/oder ein Toleranzverlauf.

Die Erfindung betrifft auch einen Kit, der das Nucleinsäuremolekül, den Vektor, die Wirtszelle, das Polypeptid, das Erkennungsmolekül und/oder die Vakzine
15 umfasst, sowie die Verwendung des Kits zur Detektion der Transplantatreaktion.

Die Erfindung weist mehrere Vorteile auf. So ist es insbesondere möglich, nach Transplantationen eine dauerhafte Kontrolle des Zustandes des Transplantates
20 durchzuführen, wobei es möglich ist, die als Marker verwendeten erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Peptide bzw. Erkennungssubstanzen aus verschiedenen Proben des Patienten, beispielsweise Urin, zu gewinnen. Somit ist es insbesondere möglich, frühzeitig Funktionsver-
25 schlechterungen des Transplantates, sozusagen am Beginn der Effektorkette, festzustellen. Durch die erfindungsgemäßen Substanzen und das erfindungsgemäße Verfahren ist es also möglich, bereits subklinisch ablaufende Prozesse frühzeitig zu diagnostizieren. Somit müssen subklinisch verlaufende
30 Reaktionen nicht mehr mit Kontrollbiopsien und konventioneller Histologie bestimmt werden. Weiterhin können die genannten Substanzen als Marker für das Monitoring von Transplantaten benutzt werden, um

5 unerwünschte Immunreaktionen vor der Organschädigung und
differentialdiagnostisch sicher zu erfassen. Das Monitoring
kann beispielsweise als Verlaufskontrolle bei Mehrfach-
immunsuppressivaschemata verwandt werden, wobei gutgehende
Funktionen einzelne oder mehrere der immunsuppressiven
10 Komponenten abgesetzt werden können, wobei das Auftreten
von akzelerierten Abstoßungsprozessen frühzeitig erkannt
werden kann. Das Verfahren lässt sich dadurch auch
individuell von Patient zu Patient optimieren. Auch ist es
durch die Marker mit Vorteil möglich, toleranzinduzierte
15 Protokolle und toleranzinduzierende Therapien auf den
Menschen zu übertragen, da nach Absetzen der
Toleranzinduktionstherapie rechtzeitig Therapieversager
identifiziert werden können, um eine irreversible
Schädigung des Transplantates zu verhindern. Das heißt, die
20 erfindungsgemäßen Substanzen, das erfindungsgemäße
Verfahren und die Verwendungen stellen exakte
Analysemethoden zur Verfügung, um die Induktion, den Erfolg
und die Erhaltung einer Toleranz zu beurteilen. Mit dem
erfindungsgemäßen Verfahren kann unter anderem auch das
25 Zusammenbrechen der Toleranz, beispielsweise durch
Vorliegen einer Infektion, vorhergesagt werden. Es ist
daher möglich, Entscheidungen über das sichere Absetzen
einer immunsuppressiven Therapie zu treffen, ohne dass
vorteilhafterweise das Auftreten von Reaktionskrisen
30 riskiert werden muss. Eine wichtige Anwendung der
erfindungsgemäßen Nucleinsäure des erfindungsgemäßen
Verfahrens ist daher die Vorhersage von Reaktionskrisen
während oder nach der Behandlung, auch nach konventionellen
Therapien, bevor eine Transplantatfunktionsverschlechterung

5 auftritt. Weiterhin wird aber auch die konventionelle
Immunsuppression durch die erfindungsgemäßen
Nucleinsäuremoleküle und das erfindungsgemäße Verfahren
hinsichtlich der Früherkennung klinischer und subklinischer
akuter Abstoßungskrisen und beginnender chronischer
10 Reaktionsprozesse verbessert. Es ist durch die Erfindung
möglich, die Therapie zu variieren, bevor eine nachweisbare
Schädigung des Transplantates vorliegt. Weiterhin ist es
möglich, die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle und die
durch sie kodierten Proteine bzw. Proteinfragmente zum
15 Screening von Arzneimitteln zu verwenden, die bei der
Diagnose und Therapie von Transplantat-Reaktionen
eingesetzt werden können.

Die Erfindung soll im Folgenden anhand von
Ausführungsbeispielen näher erläutert werden, ohne sie
20 darauf einzuschränken.

Beispiele

Beispiel 1

25 Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können in
Labortieren identifiziert werden, so beispielsweise in dem
anerkannten orthotropen Nierentransplantationsmodell: der
Ratte, bei dem die Expression der erfindungsgemäßen Marker
zur postoperativen Diagnostik verwendet werden kann. In dem
30 verwendeten Transplantationsmodell (WF Spendernieren nach
BDIX Rezipienten) kann durch mehrmalige Applikation eines
anti-CD4-Antikörpers RIB5/2 eine Toleranz gegenüber
Nierentransplantaten induziert werden, die im

5 Kontrollantikörper behandelte Empfängertiere zwischen Tag
5 und 9 abgestoßen werden. Die Toleranz zeichnet sich durch
eine lang anhaltende normale Nierenfunktion ohne
Serumkreatininanstieg bzw. Proteinurie über mehr als
300 Tage aus. Die Infiltration donor-reaktiver T-Zellen ist
10 nur zu 50% herabgesetzt, jedoch kommt es nicht zur
Zerstörung des transplantierten Organs.

Im Rahmen der Erfindung wurden von mit Kontrollantikörpern
bzw. RIB/2 behandelten Empfängertieren die in das
Transplantat eingewanderten mononukleären Zellen am Tag 5
15 nach der Transplantation durch Kollagenaseverdau und
Ficollgradient isoliert und deren mRNA Expression mit Hilfe
der „PCR-Select“ Methode verglichen. Dies führte zur
Isolierung von cDNA Fragmenten, die verstärkt in
Transplantaten rejizierender Empfängertiere exprimiert
20 werden: 2A5 und 2A15 (entspricht SEQ ID Nr. 1 und 2).
Ebenso konnten cDNA Fragmente isoliert werden, deren
Expression in Transplantaten toleranzentwickelnder
Empfängertiere erhöht ist: 1A50, 3A29, T4, T5, T8 und T10
(entspricht SEQ ID Nr. 3, 4, 5, 6, 7 und 8). In Abb. 1 sind
25 die cDNA Sequenzabschnitte der erwähnten Fragmente
dargestellt.

Von den hier dargestellten Sequenzabschnitten wurden
weiterhin erfindungsgemäß Oligonukleotidsequenzen für die
Durchführung einer Real Time RT-PCR abgeleitet. Mit Hilfe
30 dieser Oligonukleotidsequenzen ist eine relative
Quantifizierung der Expression der korrespondierenden
mRNA's in Bezug zum „house keeping gene“ β -actin in
Rattenzellen möglich. Ebenso wurden anhand der homologen

5 Mausequenzen Oligonukleotidsequenzen zur relativen
Quantifizierung der korrespondierenden mRNA's in Bezug zum
„house keeping gene HPRT“ in Mausezellen etabliert.

Mit Hilfe der so etablierten Oligonukleotidsequenzen wurden
im Rahmen der Erfindung kinetische Expressionsstudien in
10 mehreren Transplantationsmodellen durchgeführt. Neben dem
bereits erwähnten Nierentransplantationsmodell in der Ratte
wurde die Expression der Fragmente auch in einem
Herztransplantationsmodell in der Maus analysiert. In
diesem Modell wird den Empfängertieren (CBA) 4 Wochen vor
15 der Transplantation eine donor-spezifisch Bluttransfusion
(B10) in Kombination mit dem anti-CD4 Antikörper YTS177
verabreicht. Das führt zur Induktion einer donor-
spezifischen Toleranz zum Zeitpunkt der Transplantation.
Kontrollherzen in unbehandelten Empfängertieren werden
20 zwischen Tag 7 und Tag 8 abgestoßen.

In Abb. 2 sind die Ergebnisse der Expressionsanalyse für
die Fragmente 1A50, 3A29, T4, T5, T8 und T10 im
Nierentransplantationsmodell dargestellt. Abgebildet ist
die mRNA Expression der Fragmente im Transplantat für
25 Kontroll-Antikörper behandelte Empfängertiere (Co) am Tag 0
(naive Nieren), 2 und 5 nach der Transplantation, außerdem
ist die Expression für RIB5/2-behandelte
toleranzentwickelnde Empfängertiere (RIB5/2) am Tag 0, 2,
5, 10, 14 und 300 nach der Transplantation dargestellt.
30 Alle cDNA Fragmente werden in permanent akzeptierten
Transplantaten stark exprimiert, hingegen nimmt ihre
Expression in Transplantaten Kontroll-Antikörper

5 behandelter Empfängertiere zum Zeitpunkt der Rejektion drastisch ab.

Anschließend wurde die Expression der korrespondierenden mRNA's im Herztransplantationsmodell untersucht. In Abb. 3 ist die Expression der Fragmente 1A50 und T8 im
10 transplantierten Organ dargestellt. Analysiert wurde die mRNA Expression in Transplantaten vorbehandelter toleranzentwickelnder Empfängertiere (DST+YTS177) am Tag 0 (naive Herzen), 2, 5, 7, 8, 10, 40 und 100 nach Transplantation. Verglichen wurden die Ergebnisse mit der
15 mRNA Expression im Transplantat unbehandelter Kontrolltiere (Co) am Tag 0 (naive Herzen), 2, 5, 7 und 8. Auch im Herztransplantationsmodell weisen permanent akzeptierte Transplantate eine hohe mRNA Expression an 1A50 und T8 auf. In Transplantaten rejizierender Empfängertiere ist die
20 Expression wiederum stark vermindert.

Die unterschiedliche Expression an 1A50 und T8 widerspiegelt sich auch im peripheren Blut. Nur in Blutzellen von unbehandelten Empfängertieren (Co) kommt es kurz vor der Rejektion (Tag 5) zum Abfall der Expression
25 von 1A50 und T8 (Abb. 4).

Weiterhin wurde die Expression der cDNA Fragmente 2A5 und 2A15 im Nierentransplantationsmodell (Abb. 5) und im Herztransplantationsmodell (Abb. 6) untersucht. Dargestellt ist jeweils die Expression dieser cDNA Fragmente im
30 Transplantat rejizierender Empfängertiere. In beiden Modellen kommt es zur Hochregulation der mRNA Expression kurz vor der Rejektion.

5 Mit Hilfe der Identifizierung und Quantifizierung von
solchen Genmarkern, deren Expression im Transplantat, in
Flüssigkeiten aus dem Transplantat (Urin, Lavage) oder
peripherem Blut entweder mit einer lang anhaltenden guten
Transplantatfunktion oder dem Auftreten von Rejektionen
10 korreliert, wäre eine Beurteilung der toleranzinduzierenden
Therapie besser möglich.

Die Expression von 2A5 und 2A15 kann in der Biopsie zur
Beurteilung von akuten subklinischen Rejektionskrisen und
beginnender chronischer Rejektionen verwendet werden. Dabei
15 wäre eine starke, lang anhaltende Expression mit einer
Rejektion des Organs assoziiert. Dies ist nur bedingt
abhängig vom Ausmaß der Infiltration mononukleärer Zellen
in das Transplantat, da in anti-CD4 behandelten
toleranzentwickelnden Empfängertieren im Nierentransplan-
tationsmodell die Infiltration der mononukleären Zellen nur
20 zu 50% reduziert ist. Dies würde die Auswertung einer
Biopsie erheblich verbessern, da nicht nur die Infiltration
in das Organ als Kriterium für eine akute Abstoßung
herangezogen wird, sondern auch qualitative Veränderungen
25 der infiltrierenden Zellen. Die Expression von T4, T5, T10,
3A29, T8 und 1A50 in der Biopsie kann z.B. zur Beurteilung
des Therapieerfolges herangezogen werden. Dies würde eine
Entscheidung über die sichere Beendigung der
toleranzinduzierenden Therapie ermöglichen.

30 Der starke Expressionsabfall von 1A50 und T8 in der
Peripherie in rejizierenden Empfängertieren mehr als 2 Tage
vor klinischer Manifestation der Rejektion ermöglicht eine
non-invasive Diagnostik im Blut des Patienten bevor eine

5 Organverschlechterung (z.B. Anstieg des Serumkreatinins)
nachweisbar ist.

Die Expression von 2A5 und 2A15 in der Biopsie kann zur
Beurteilung von akuten klinischen und subklinischen
Rejektionskrisen und beginnender chronischer Rejektionen
10 verwendet werden. Dabei ist eine starke lang anhaltende
Expression mit einer immunologischen Rejektion des Organs
assoziiert. Dies ist nur bedingt abhängig vom Ausmaß der
Infiltration mononukleärer Zellen in das Transplantat, da
in anti-CD4 behandelten toleranzentwickelnden
15 Empfängertieren im Nierentransplantationsmodell die
Infiltration der mononukleären Zellen nur zu 50% reduziert
ist. Dies verbessert die Auswertung einer Biopsie
erheblich, da nicht nur die Infiltration in das Organ als
Kriterium für eine akute Abstoßung herangezogen wird,
20 sondern auch die qualitative Veränderung der
infiltrierenden Zellen. Die Expression von T4, T5, T10,
3A29, T8 und 1A50 in der Biopsie wird zur Beurteilung des
Therapieerfolges herangezogen. Dies ermöglicht eine
Entscheidung über die sichere Beendigung der
25 toleranzinduzierenden Therapie. Der starke
Expressionsabfall von 1A50 und T8 in der Peripherie in
rejizierenden Empfängertieren mehr als 2 Tage vor der
Rejektion ermöglicht eine non-invasive Diagnostik im Blut
oder anderen Körperflüssigkeiten, wie in dem Urin, der
30 Patienten bevor eine Organverschlechterung, wie der Anstieg
des Serumkreatinins, nachgewiesen werden kann. Somit ist
folgendes Diagnostikmodell nach der Transplantation
erfolgreich:

- 5 1. Nachweis von 1A50 und T8 im Blut oder anderen
Körperflüssigkeiten (z.B. Urin) des Patienten täglich
kurz nach der Operation und wöchentlich/monatlich im
weiteren Verlauf, um eine Rejektionskrise und damit
Fehlschlagen der Therapie vorherzusagen bzw. bei
10 Absetzversuchen eine Untersuppression zu detektieren,
bevor eine Organverschlechterung nachweisbar ist.
2. Nachweis von 2A5 und 2A15 in Kontrollbiopsien oder
transplantatrelevanten Körperflüssigkeiten (z.B. Urin
bei Nierentransplantation), um ebenfalls
15 Rejektionskrisen bzw. eine Untersuppression
rechtzeitig zu detektieren und die Gefahr der
Entwicklung einer chronischen Abstoßung vorherzusagen.
3. Nachweis von T4, T5, T8, T10, 1A50 und 3A29 in
Kontrollbiopsien oder transplantatrelevanten
20 Körperflüssigkeiten, um den Erfolg der
toleranzinduzierenden oder konventionellen Therapie
einzuschätzen, insbesondere, um das gefahrlose
Absetzen/Reduzieren der Therapie zu ermöglichen.

25 Beispiel 2

In einem weiteren Tiermodell für Toleranz wurden Biopsien
von Mäusen untersucht, die spontan, d.h. ohne medikamentöse
Beeinflussung allogene Lebern akzeptieren
(Lebertransplantate von B10 Mäusen auf CBA Empfängermäuse),
30 d.h. eine spontane Toleranz entwickeln - ein Phänomen, dass
auch nach allogener Lebertransplantation nach einigen
Jahren auftreten kann. Am Tag 0, 1, 2, 5, 7, 8, 10, 40, 100 nach

5 Transplantation wurden in den Transplantaten dieselben
Marker wie zuvor nach Nieren- bzw. Herztransplantation
untersucht. Abb. 7 fasst die Ergebnisse vergleichend
zusammen. Die Spontantoleranz mit transienter
selbstlimitierender Abstoßungskrise in diesem Modell
10 spiegelt sich in einer stabil hohen Expression der
Toleranz-Marker T8 und 1A50 über den gesamten
Beobachtungszeitraum sowie einem nur temporären Anstieg der
Rejektionsmarker 1A6, 2A5, 2A15 in der ersten Woche nach
Transplantation wider.

15 Dies unterstreicht in einem weiteren experimentellen Modell
die klare Assoziation der Expression der genannten Marker
mit Toleranz bzw. Rejektion.

Beispiel 3

20 Im beschriebenen Maus-Herztransplantationsmodell konnte
gezeigt werden, dass ein Großteil der Herzen nach
Toleranzinduktion mit beschriebenen Protokoll langfristig
überlebt, dass jedoch einige Herzen Zeichen einer
chronischen Rejektion entwickeln, die mit einer
25 Funktionseinschränkung einhergehen. Diese kann durch den
"Herzpalpationscore" (palpatorische Bestimmung der Stärke
und des Rhythmus (des Herzschlages) bestimmt werden, wobei
ein hoher Score (>3) eine gute Herzfunktion bedeutet. Im
Doppelblindansatz wurden Herzpalpationsscore und Expression
30 der Toleranzmarker T8 und 1A50 vergleichend bestimmt und
gegeneinander korreliert (Abb. 8). Es ergab sich eine klare
Korrelation zwischen der Herzfunktionsfähigkeit und der

5 Expression von T8 ($r=0,785$) bzw. 1A50 ($r=0,784$). Dies bedeutet, dass die beiden Toleranzmarker sich sehr gut für die Voraussage einer inkompletten Toleranz, die zwar eine akute Rejektion nicht aber die Entwicklung einer chronischen Rejektion verhindert, eignen.

10

Beispiel 4

Zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass für die Aufrechterhaltung einer stabilen peripheren Toleranz die Bildung von spezifischen regulatorischen CD4+ T-Zellen
15 notwendig ist, die offenbar im toleranten Transplantat akkumulieren und dort die Aktivierung und Wirkung von Effektor-T-Zellen hemmen. Wie publiziert kann man auch in unseren Modellen mit Milzzellen und noch effektiver mit transplantatinfiltrierenden Zellen (TIZ) Toleranz auf naive
20 Empfängertiere übertragen ("infectious tolerance"). Um zu prüfen, ob die benannten Toleranzmarker T8 und 1A50 in diesen Zellen überexprimiert sind, wurden die TIZ mittels Kollagenaseverdaus aus den Transplantaten isoliert, mittels spezifischer Antikörper sortiert und hinsichtlich ihrer
25 Genexpression charakterisiert. Die Daten zeigen, dass 1A50 und noch stärker ausgeprägt T8 in TIZ von Transplantaten toleranter Tiere im Vergleich zu denen rejektierender Tiere stark überexprimiert ist und dass diese Expression in sortierten CD4+ TIZ nachweisbar wird (Abb. 9). Dies weist
30 daraufhin, dass offenbar transplantatinfiltrierende regulatorische T-Zellen diese Toleranzmarker exprimieren.

5 Beispiel 5

Es wurden die humanen Homologe der genannten Sequenzen identifiziert. Es wurde nun geprüft, ob die Marker mittels real-time RT-PCR auch in Biopsien und Blutleukozyten von nierentransplantierten Patienten detektierbar sind. 1A50, 2A5, 2A15 waren in allen Biopsien bzw. Blutproben nach Nierentransplantation nachweisbar. Patient 1 entwickelte eine akute Abstoßung am Tag 23 nach Lebendspendetransplantation. Zu diesem Zeitpunkt konnte eine Abnahme des Toleranzmarkers 1A50 und eine Zunahme des Rejektionsmarkers 2A15 in den peripheren Leukozyten beobachtet werden (Abb. 10). Patient 2 zeigte einen komplikationslosen Verlauf und kaum Schwankungen in der Expression dieser Marker.

Weiterhin wurden Biopsien aus den Transplantaten nierentransplanterter Patienten mittels real-time RT-PCR analysiert. Patient 3 und 4 zeigten in Biopsien Zeichen einer subklinischen Rejektion Banff - Grad Ia bzw. Ib. Der Toleranzmarker 1A50 war bei Rejektion relativ niedrig exprimiert (besonders Patient 4) im Vergleich zu Biopsien von Patienten mit stabiler Funktion und ohne Zeichen einer Abstoßung im Transplantat (Patient 5+6) (Tabelle 1). Im Gegensatz dazu, war die Expression des 2A15 Rejektionsmarkers am höchsten in den beiden Proben mit Rejektion (Patient 3+4) und deutlich niedriger bei normaler Funktion (Patient 5+6). 2A5 war ähnlich detektierbar zeigte aber geringere Unterschiede.

5 Damit bestätigen die ersten Patientendaten, dass die Gene
auch im Humansystem detektierbar sind und dass sich ihre
Regulation sehr ähnlich zu der in den Tiermodellen verhält.

10 Tabelle 1: Genexpression in Nierenbiopsien transplanterter
Patienten

Patient Nr.	Transplantatfunktion	Genexpression (Units Ratio zu HPRT)		
		1A50 ($\times 10^{-1}$)	2A15($\times 10^{-1}$)	2A5($\times 10^{-1}$)
15 3	akute Rejektion	3,0	5,2	0,2
4	akute Rejektion	1,8	4,0	0,2
5	stabil normale Funktion	5,5	0,4	0,1
6	stabil normale Funktion	7,9	0,2	0,1
7	Kontrollniere			
20	(kein Transplantat)	4,0	0,2	0,1

5

Patentansprüche

1. Isoliertes Nucleinsäuremolekül ausgewählt aus der Gruppe umfassend:
- 10 a) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1 - 8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen,
- 15 b) ein Nucleinsäuremolekül, welches mit einer Nucleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen hybridisiert,
- c) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) oder b) funktionsanalog zu sein,
- 20 d) ein Nucleinsäuremolekül, das in Folge des genetischen Codes zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) - c) degeneriert ist und
- 25 e) ein Nucleinsäuremolekül gemäß einer Nucleotidsequenz nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) bis d) ist.

- 5 2. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, dass
die unter c) angegebene Nucleotidsequenz mindestens 40%
homolog zu einer der unter a) angegebenen
Nucleotidsequenz ist.
- 10 3. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, dass
die unter c) angegebene Nucleotidsequenz mindestens
60%, vorzugsweise 70%, bevorzugt 80%, ganz besonders
15 bevorzugt 90% homolog zu einer der unter a) angegebenen
Nucleotidsequenz ist.
- 20 4. Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, dass
es eine genomische DNA, eine cDNA und/oder eine RNA
ist.
- 25 5. Vektor umfassend ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem
der Ansprüche 1 bis 4.
- 30 6. Wirtszelle umfassend den Vektor gemäß Anspruch 5.
7. Polypeptid, kodiert durch ein Nukleinsäuremolekül gemäß
einem der Ansprüche 1 bis 4.
8. Erkennungsmolekül gerichtet gegen ein
Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4,

5 einen Vektor gemäß Anspruch 5, eine Wirtszelle gemäß
 Anspruch 6 und/oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 7.

9. Erkennungsmolekül nach Anspruch 8,
 dadurch gekennzeichnet, dass
10 es ein Antikörper, ein Antikörperfragment und/oder ein
 Antisense-Konstrukt ist, insbesondere ein RNA-
 Interferenzmolekül.

10. Vakzine, umfassend ein Nucleinsäuremolekül gemäß einem
15 der Ansprüche 1 bis 4, einen Vektor gemäß Anspruch 5,
 eine Wirtszelle gemäß Anspruch 6 und/oder ein
 Polypeptid gemäß Anspruch 7 und/oder ein
 Erkennungsmolekül nach Anspruch 8 oder 9 gegebenenfalls
 mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger.

20

11. Verfahren zur Detektion von Transplantat-Reaktionen in
 einer Probe von einem Patienten,
 dadurch gekennzeichnet, dass
 in der Probe ein Level von mindestens einem
25 Nucleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4
 bestimmt und der Level mit einem Kontroll-Level einer
 Vergleichsprobe von einem gesunden Patienten verglichen
 wird, wobei durch einen modifizierten Level in der
 Probe im Vergleich zu dem Kontroll-Level die
30 Transplantat-Reaktionen bzw. das Fehlen selbiger
 (Toleranz) detektiert wird.

- 5 12. Verfahren nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet, dass
das Transplantat ausgewählt ist aus der Gruppe
bestehend aus Lunge, Milz, Herz, Niere, Leber, Pankreas
allein oder in Kombination und/oder von Geweben,
10 insbesondere Inseln, Aorten, Knorpel.
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12,
dadurch gekennzeichnet, dass
als der Level eine DNA-, eine RNA-Konzentration, eine
15 Genexpression, eine Kopienanzahl einer Nucleinsäure,
eine Peptidkonzentration, eine Peptidaktivität und/oder
eine Konzentration von Isoformen, bestimmt werden.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13,
20 dadurch gekennzeichnet, dass
der Level als eine mRNA-Konzentration bestimmt wird.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 14,
dadurch gekennzeichnet, dass
25 als die Transplantatreaktion eine Rejektionskrise, eine
Abstoßungsreaktion, ein Abstoßungsverlauf, eine
Toleranzreaktion und/oder ein Toleranzverlauf
detektiert werden.
- 30 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15,
dadurch gekennzeichnet, dass

5 durch einen verminderten Level eines
Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz
ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 3
und SEQ ID Nr. 7 oder deren komplementären
Nucleotidsequenzen die Abstoßungsreaktion, der
10 Abstoßungsverlauf und/oder die Rejektionskrise
detektiert wird.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15,
dadurch gekennzeichnet, dass
15 durch einen erhöhten Level eines Nucleinsäuremolekül
umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der
Gruppe bestehend aus SEQ ID 1 und Nr. SEQ 2 oder deren
komplementären Nucleotidsequenzen die
Abstoßungsreaktion, der Abstoßungsverlauf und/oder die
20 Rejektionskrise detektiert wird.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15,
dadurch gekennzeichnet, dass
durch einen erhöhten Level eines Nucleinsäuremolekül
25 umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der
Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID
Nr. 5, SEQ ID Nr. 6, SEQ ID Nr. 7 und SEQ ID Nr. 8 oder
deren komplementären Nucleotidsequenzen die
Toleranzreaktion oder der Toleranzverlauf detektiert
30 wird.

19. Verwendung eines Nucleinsäuremoleküls gemäß einem der
Ansprüche 1 bis 4, eines Vektor gemäß Anspruch 5, einer

5 Wirtszelle gemäß Anspruch 6, eines Polypeptid gemäß
Anspruch 7, eines Erkennungsmolekül nach Anspruch 8
oder 9 und/oder einer Vakzine gemäß Anspruch 10 in der
medizinischen Prophylaxe, klinischer Verlaufskontrolle,
Transplantat-nachbehandlung, klinischer Diagnostik
10 und/oder Therapie.

20. Verwendung nach Anspruch 19 zur Detektion von T-Zell-
vermittelten Immunprozessen, insbesondere pathogenen T-
Zell-vermittelten Immunprozessen.

15

21. Verwendung nach Anspruch 19 oder 20,
dadurch gekennzeichnet dass
die T-Zell-vermittelten Immunprozesse Autoimmun-
erkrankungen oder Entzündungen sind, insbesondere eine
20 antiglomeruläre Basalmembrankrankheit, Autoimmun-
krankheiten des Nervensystems, ein systemischer Lupus
erythematoses, eine Addison-Krankheit, ein
Antiphospholipid-Syndrom, eine IgA-Glomerulonephritis,
ein Goodpasture-Syndrom, ein Lambert-Eaton-Myasthenie-
25 Syndrom, ein bullöses Pemphigoid, eine
thrombozytopenische, idiopathische Purpura, eine
Autoimmun-Thyreoiditis, eine rheumatoide Arthritis, ein
insulinabhängiger Diabetes mellitus, ein Pemphigus,
eine autoimmunhämolytische Anämie, ein Dermatitis
30 herpetiformis Duhring, eine membranöse
Glomerulonephritis, eine Graves-Krankheit, eine
sympathische Ophthalmie, Autoimmun-Polyendo-

5 krinopathien, multiple Sklerose und/oder Reiter-
Krankheit.

22. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 21,
dadurch gekennzeichnet dass
10 die T-Zell-vermittelten Immunprozesse physiologische,
pathologische, klinische und/oder subklinische
Transplantat-Reaktionen sind.

23. Verwendung nach Anspruch 22,
15 dadurch gekennzeichnet, dass
die Transplantat-Reaktionen eine Rejektionskrise, eine
Abstoßungsreaktion, ein Abstoßungsverlauf, eine
Toleranzreaktion und/oder ein Toleranzverlauf.

20 24. Kit umfassend ein Nucleinsäuremolekül gemäß einem der
Ansprüche 1 bis 4, einen Vektor gemäß Anspruch 5, eine
Wirtszelle gemäß Anspruch 6, ein Polypeptid gemäß
Anspruch 7, ein Erkennungsmolekül nach Anspruch 8 oder
9 und/oder eine Vakzine gemäß Anspruch 10.

25 25. Verwendung des Kits nach Anspruch 24 zur Detektion
einer Transplantatreaktion.

SEQ ID Nr.: 1

Seq ID: 2A5

ACTTTCTCTA TAGCTCCTGG TAAGTAAATT TCTTTCTCCA ATACTTTTGG 50
AGTTAAATGT TTTAGTTTAT GTGGGGGTTT AGTTATGTTG GTTGGTTGTA 100
G 101

SEQ ID Nr.: 2

Seq ID: 2A15

ATTTTAAAA AGCAGCCGGG GCCTGGGGTT TCTACCCGTG TACCAGGGGC 50
CCTCTGGCCC AGAGCTGACC AAATCTGGCT CCATGGAGCA CACAGAGGCT 100
TTGATCAGGG ACAGTAATCC TCTGCAACAT CAGGAATGGC TGAATGCACA 150
GGATTACCA AGCCTCAGCC AAAGCATCCC GTGGCCTGAT GTCTCGGAGC 200
AACCCTGTCC ACACGAGGAA AGGTCAGGCC TGCTCAACAT GACCAAGATT 250
GCTCAAGGAG GGCACAACT CAGGAAGAGC CGGGGCCCTG CTTGGGTAG 299

Abb. 1A

SEQ ID Nr. 3

Seq ID: 1A50

GACTTTATTC ACAATAGAGA AATTTTACAA ATATAATTTT TAAAAATTAT 50
GTGTCAATCT ATTATGTTTT CCGTAACATC AGAGATTTAT ATAAAGTTGG 100
AAACAACAGA ATGCACTTAT GAACAAATCA AAAACAATGT TTAAATTGGA 150
TGGATACACA CGACAGAGAA GTCCTGAGT TCTCTAAATG AGCACACAAC 200
TTATAGGTGT ATATTAAGT CACAAAGTAT CCAAACATG TTTGTAACAC 250
AAAATCGGGT GCTACTTTAA CTGCTCACCT TTAAGGGCGT GGATCATACA 300
TGTAAGTCAA ATTGCACAGC TTTGTTGGAA ATGAATGACT CGTCATCTAT 350
TTGGAGACTT CCGTTGCTTA AAATTGACAC AAAAGCCTAA TCAATTACGC 400
TACTATAAAA TTTGTCTCTT ATCTCGTTA AATTTTGGT GTTCTGTGAT 450
CTGGCATTAA AAAACAGTCC AAGTTTTAAA ACAGAAAACA TTGCTCGCCA 500
GTTGGAGAGT AGCTCGTGGT TCGGCTTCT CCCTGCTCGA ACCGGAACAA 550
ACGCTACAGT 560

SEQ ID Nr. 4

Seq ID: 3A29

ACATTCATTA TTAAATGTGA TAATAGAGGT AGAGGTATAA ATAATATGAA 50
GGGGTGAGGG AACCAGTTCT ACCCGGTTTG TTTTGAATGC TTAAATTATG 100
TAATTTAAAT AGATAATCTT TACTTATGTA GGTCTTTTGG AAATAACTTT 150
ATAAATTTAA CACAGAGGAC TACTACTAAA CGTGAGAGGT ATGATAATCG 200
GCATGGAAGT TGGGCTGGTT GACCACCAA GTTCAATTCT TAAAGACATC 250
TTAATCCTGA ATATAAAAAT GCCTTTGTGG GTTTAGAATT AGAATTTAAT 300
TTTGGCATT 310

SEQ ID Nr. 5

Seq ID: T4

ACTGCATGAT GGGTTTTATT GAGACCAGGG GACAGTGTGA CACTCAGGGG 50
TTTTCCTTCA TAACTTCTTT TATCCAGGAG GTGAACCTAA TAAGTTTGGT 100
GTAGATGGCT GGCATGTTGG TTTTGGCGCA TGATAG 136

SEQ ID Nr. 6

Seq ID: T5

CTATCATGCG TGTAGTCTTG GTGCCCTGGC CGAGTTAGAA GCCAGCTGAG 50
ATAGCTTGCA GCATCTCTTC TAGTTTGAGT GATGATGTAA TGAGGAAAAT 100
CTAGTAGGTA GAAAGAGTTC AGGAAGAAGG AAACCCTCCT CTGCCTTTGA 150
AAAGAGGCTC TGCAGGAGCA TCACGCCCTT CACAGAGAAG AGTGTAGACT 200
GGCTTTCCAC TAGTGTTGAA CCTACACTCT TCGGTGGGTT AACAGTCATG 250
TGCTCGCCAT CAGAGCCTTT TTGCATGCAG TGGTGGGCTC TCCCGGTTTA 300
TCCCACCTCC CACAGGTGAT TAAACCACAG CCCTGTAAAA AAAAAA 347

SEQ ID Nr. 7

Seq ID: T8

TTACCCACAG TGCATTATAA CAAAGGAGAT GCTAAAGTCA GTTTTTCATG 50
TTTGTGGTTT TTCTGAAACA TCATTCATT AAACAATTCA AATATATGTT 100
CAAAATAAGA AGTGGTTTAT AAAAGGATTG TGTGTGCCAT GTGGCTTTTG 150
ACCCGTGCTA TTATAAATGT TGCCATAAAT ACTCTCTATA AGAAACAGTC 200
CTTAAGTAGA TTTGGTGGCA CACATCTTTA ATCCCAGCAC TTGGGAAGCA 250
GAGACAGGTG GATCTCTGTG AGTTTAAGAC CAACCTGGTC TATAAAGTGA 300
GTTCAGGAC AGCCAGGGTT GTTAAACATA GAGAACTCT GGGGCGATGG 350
GGAGGGGTCT CGTCAAACAT GAAATTTATT AGAAAATTGG TCGGATTAAG 400
CTATGTCTAG TATCAACTAA TATGGAATCT TGTATAATCT GTGTTACATT 450
GGATTTGTCT CAGAACTAAT TGTTTCATAA TAAACTATGC CTTGGCCACC 500
ACGAAAAAAAA AAA 513

SEQ ID Nr. 8

Seq ID: T10

AGGCTAGGGC TAGTTCTGCG GACCCTCTCG GAGAGAGGAA TAAGGTTGAA 50
CTGCCTGTCC GGTTCTCCTT CCCCTATTCC CAGATGCAGG TGGAAGCCTC 100
CCTCTAGTCC TTCCCCCTAA CCGCGACGAA GACCTTGGCT AACACTTGCT 150
CCTTTCGCAC ACCATAGAAA ATGCAGTGCA GACAAACACA GCCTCGTCAG 200
GCGCTTGAGG AGCGAAGTCC AATCTGGGTC GGCACCTGCA CCAGGTCTTT 250
GCGCACCTGG TCAGAAGACC GGCACCCAAT AGTTGCTTAT TAAACTCTAC 300
GTTTGTCCCG AAA 313

Abb. 1C

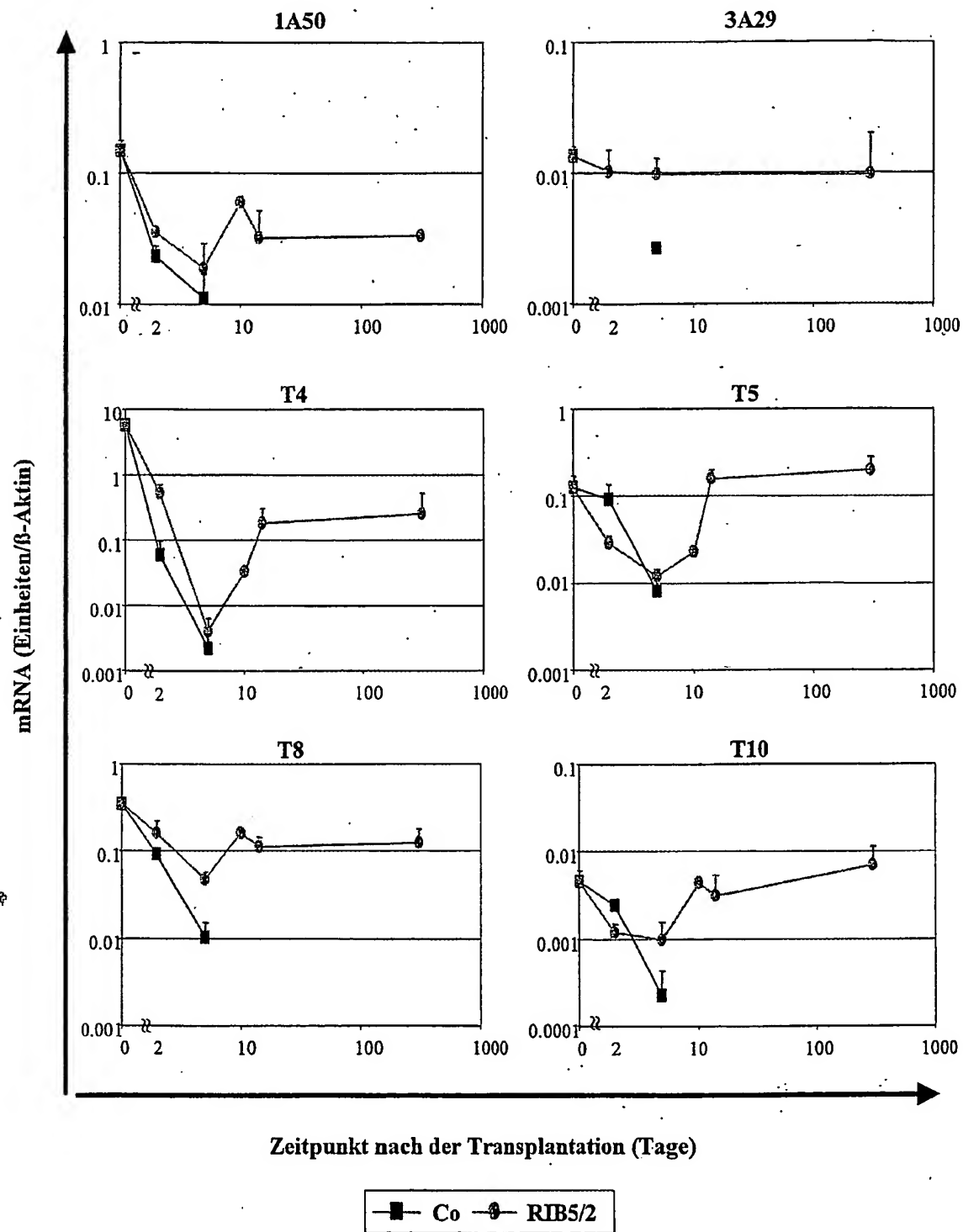


Abb. 2

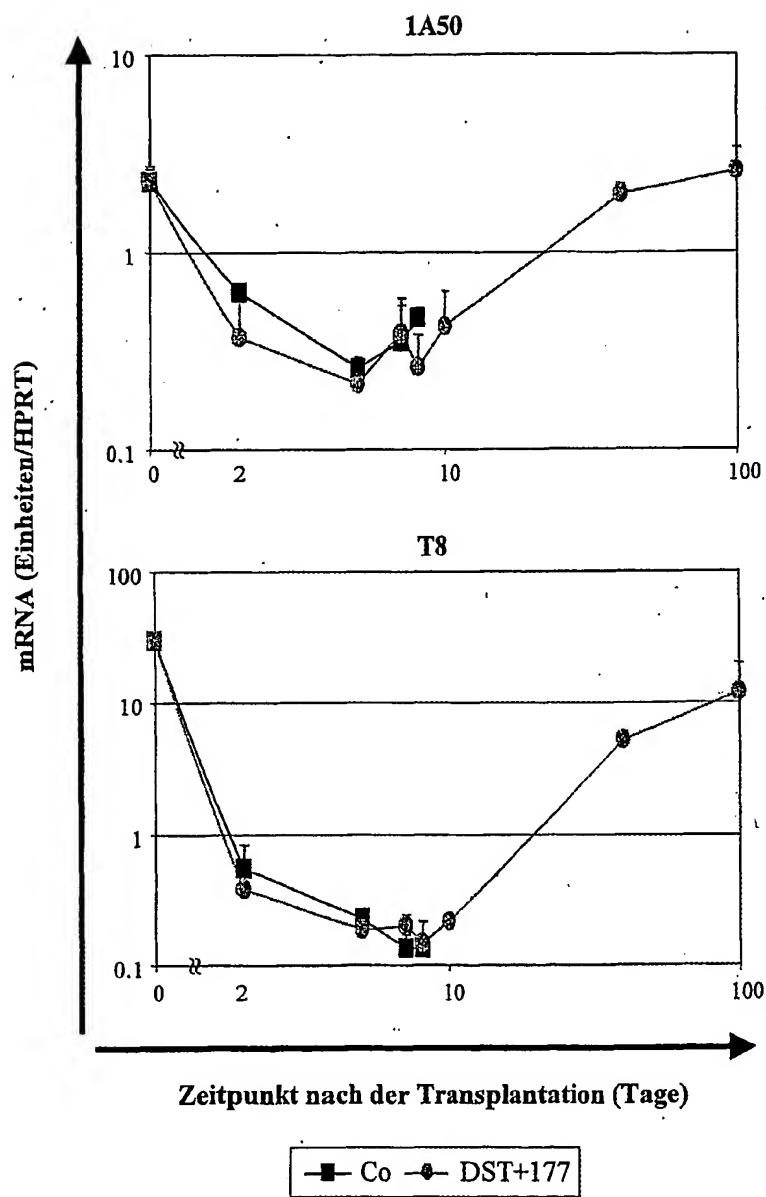


Abb. 3

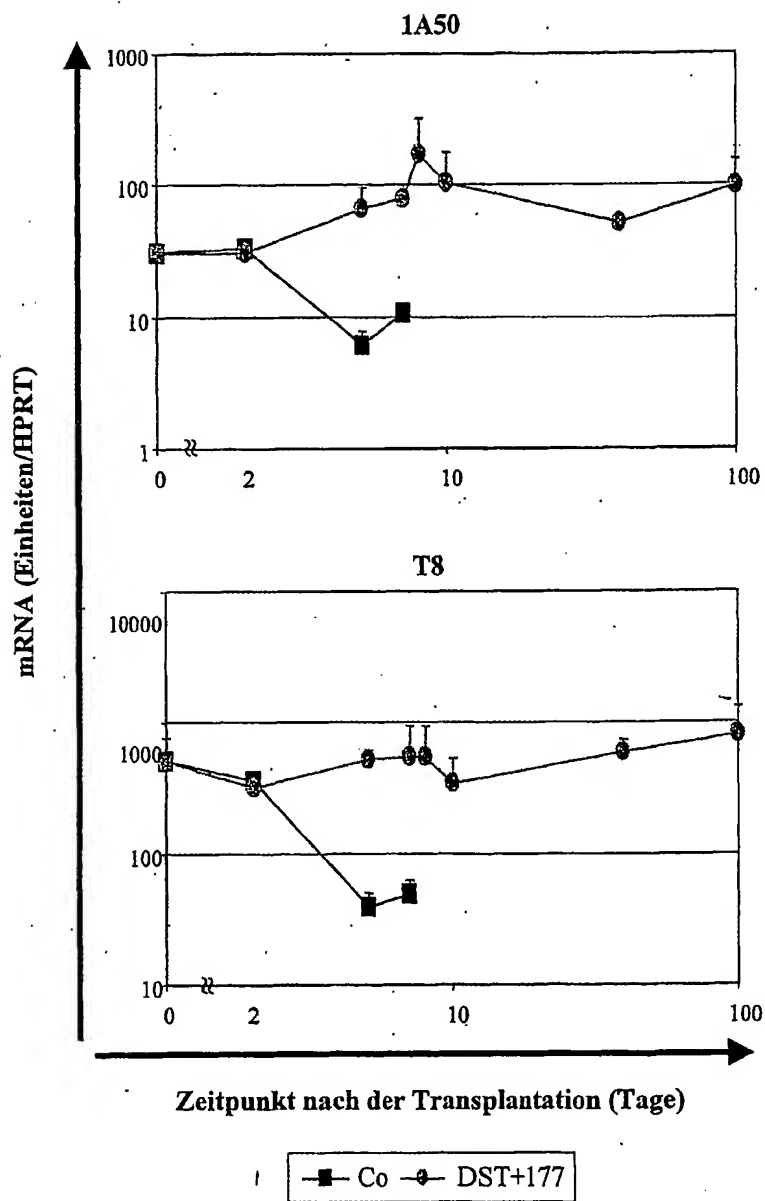


Abb. 4

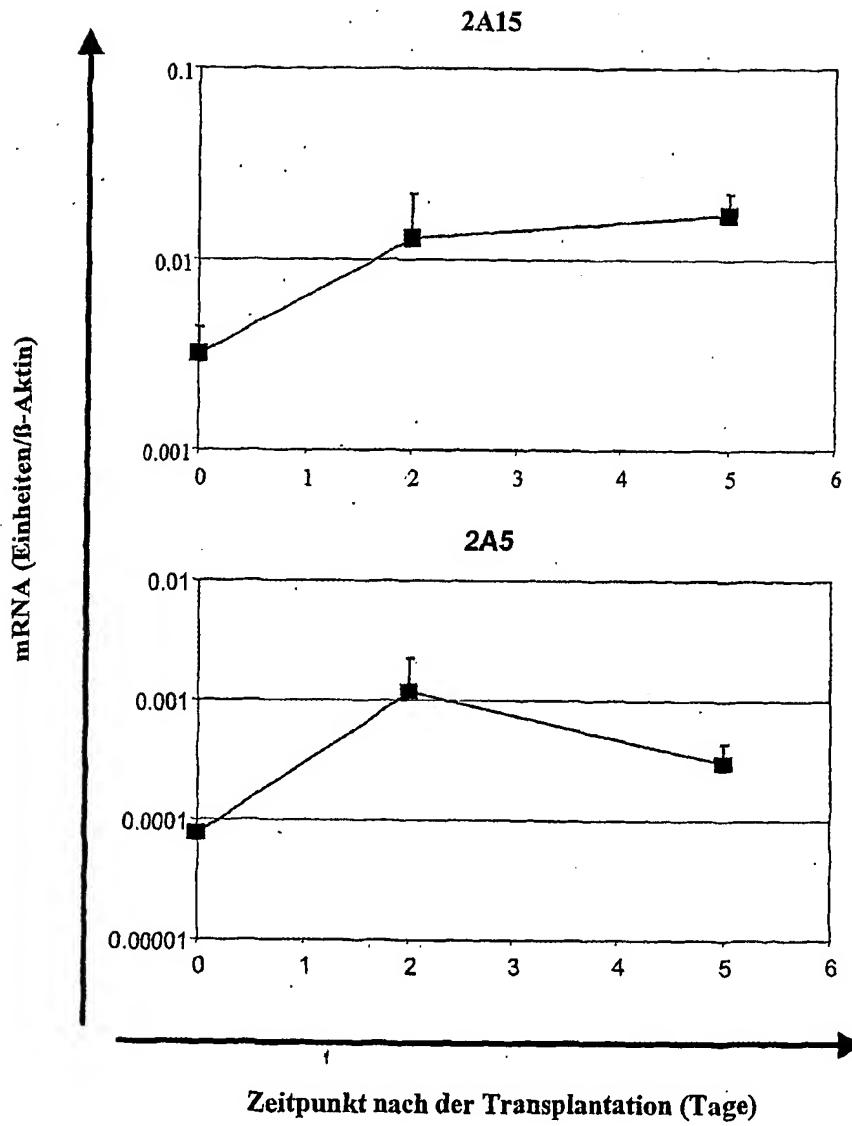


Abb. 5

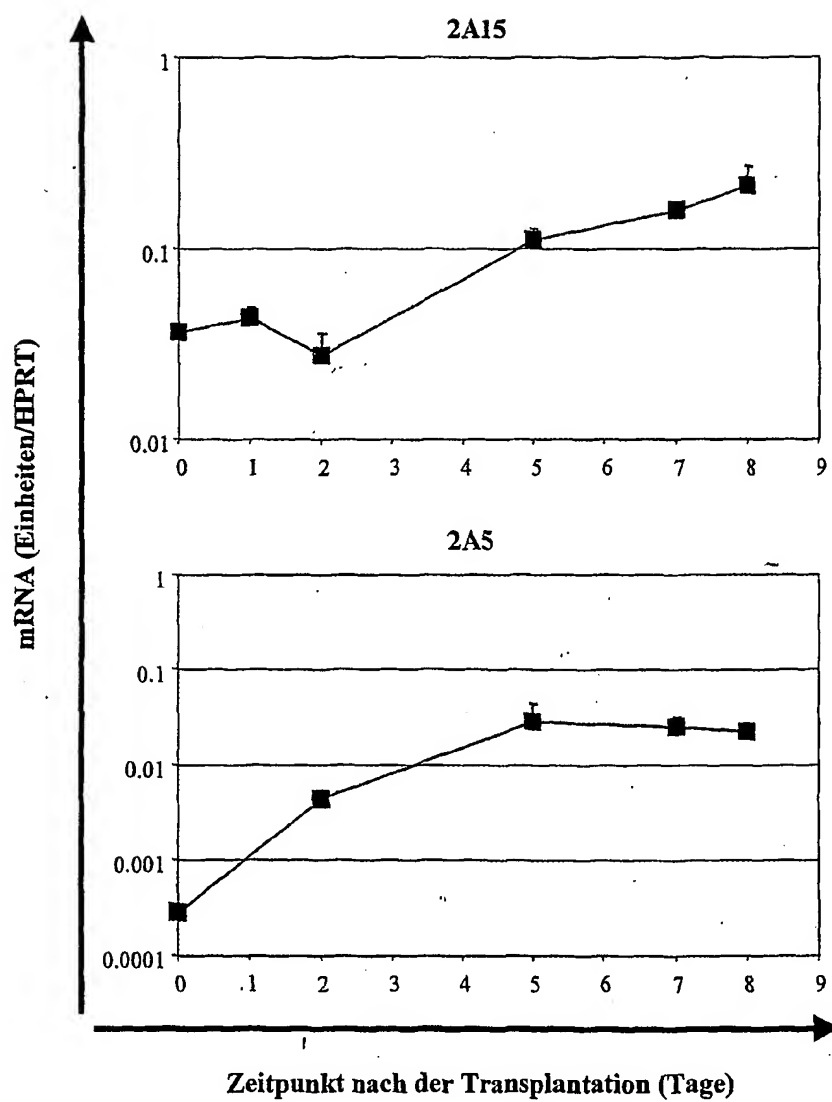


Abb. 6

Abb. 7

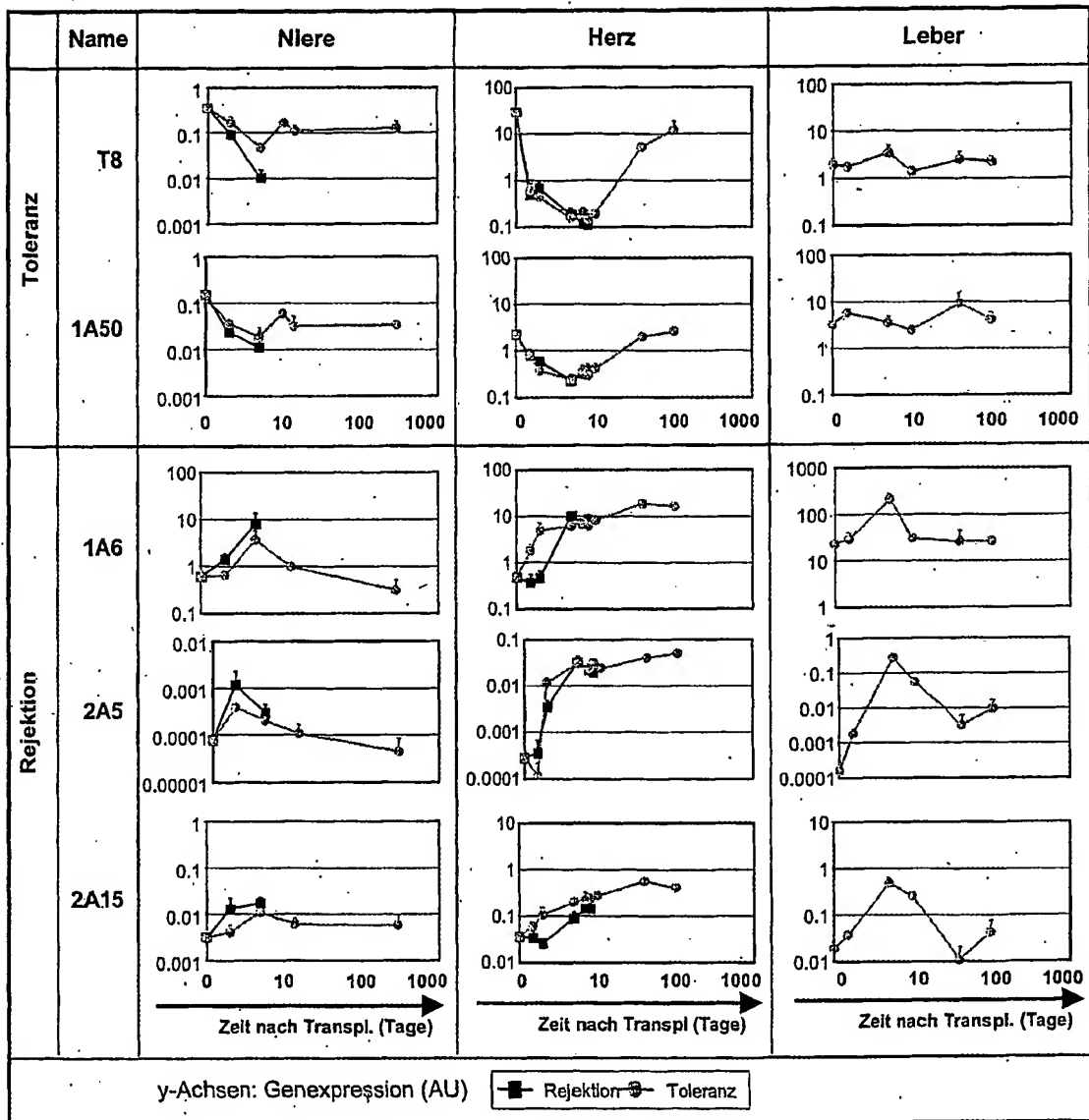


Abb. 8

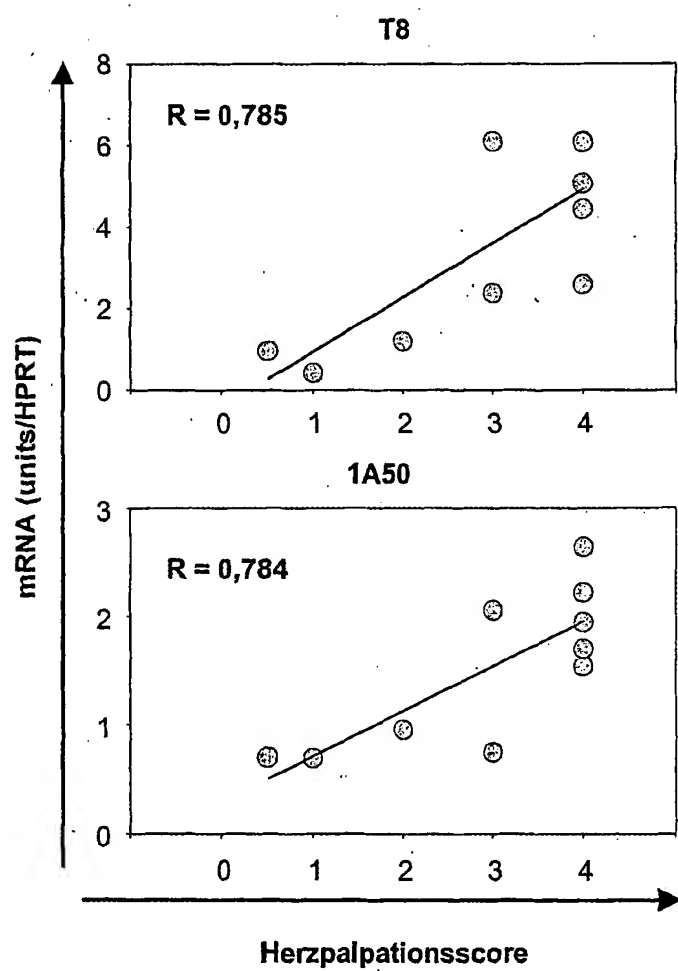


Abb. 9

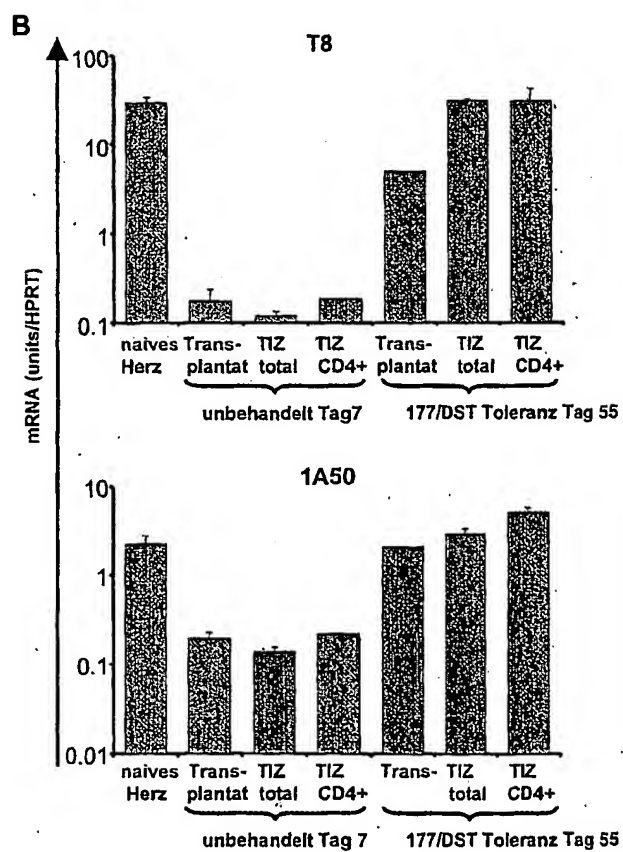
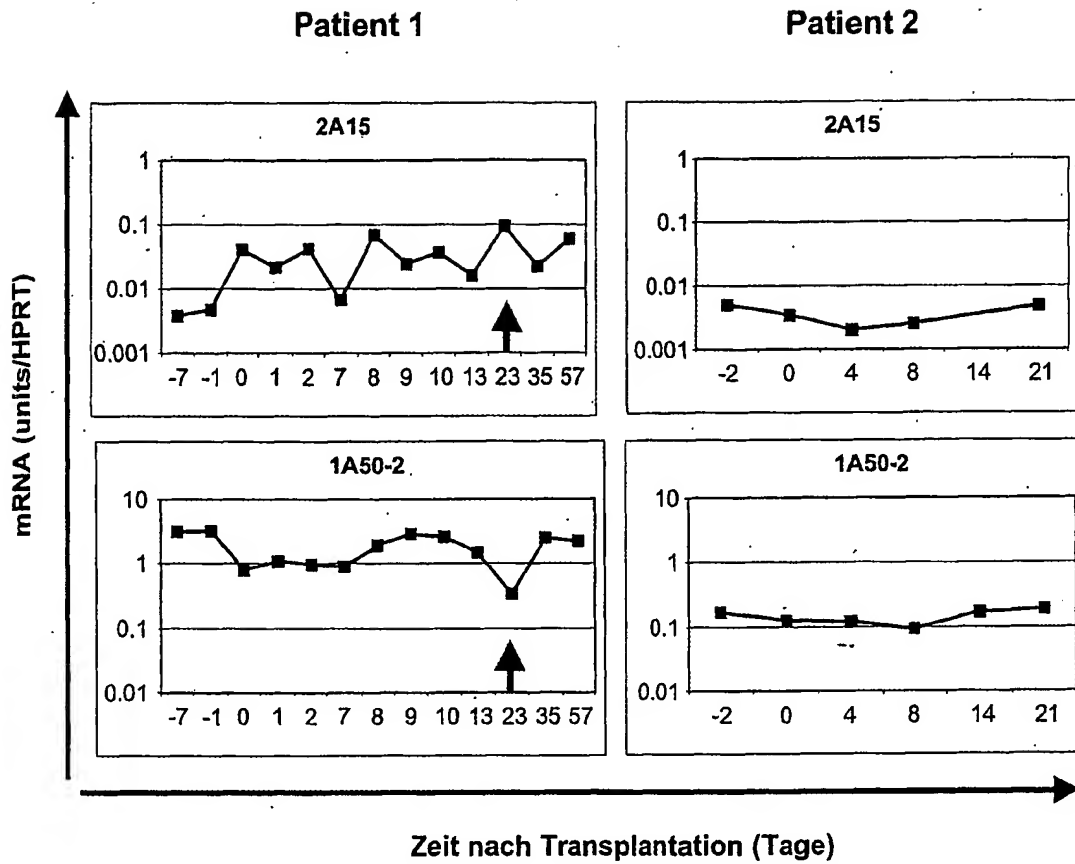


Abb. 10



↑ Biopsie-abgesicherte Diagnose einer akuten zellulären Rejektion